

María de Jesús González Ramos,  
Yadira Yumiko  
De la Cruz Rodríguez,  
Miguel Alvarado Rodríguez,  
Saúl Fraire Velázquez\*  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

\*Autor responsable

[sfraire@uaz.edu.mx](mailto:sfraire@uaz.edu.mx)

## TRANSFORMACIÓN DE RAÍZ EN CHILE CON *Rhizobium rhizogenes* Y CAMBIOS EN LA INTERACCIÓN CON AGENTE AVIRULENTO Y EN LA EXPRESIÓN DE UN GEN TIPO RECEPTOR-PROTEÍNA CINASA

ROOT TRANSFORMATION OF CHILI WITH *Rhizobium rhizogenes* AND CHANGES IN THE INTERACTION WITH AN AVIRULENT AGENT AND IN THE EXPRESSION OF A RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE GENE

### R E S U M E N

Una estrategia para buscar un mejor desempeño de la raíz en Chile en el comportamiento ante microorganismos y en la toma de agua y nutrientes, es mediante la transformación con *Rhizobium rhizogenes* para producir plantas con raíz transformada y tallo y follaje normales. Diversas cepas de *R. rhizogenes* difieren en su virulencia al ser inoculadas en diferentes fondos genéticos de una especie de planta, cultivada o silvestre. Una tarea pendiente es la optimización del protocolo de transformación en raíz de Chile y el análisis de la fisiología de la rizósfera. El objetivo del presente trabajo fue analizar diferencias en raíces de Chile mirasol transformadas con cepas A4 y K599 de *R. rhizogenes*, cambios en la arquitectura del sistema radical y en el comportamiento en la interacción con *Rhizoctonia solani* virulenta y avirulenta, además en la expresión de un gen tipo receptor proteína cinasa como un presunto gen de defensa. Los resultados mostraron que la transformación de raíz en Chile con cepas K599 y A4 resultó en 64% y 100% de plantas transformadas respectivamente, y que A4 promovió mayor ramificación de la raíz, y K599 promovió raíces más largas; y en plantas con raíz transformada, la interacción amigable raíz-*R. solani* binucleada avirulenta se vio comprometida, además, la sobre-expresión del gen en estudio ascendió notablemente en comparación con planta con raíz transformada sin inocular, y planta sin transformar y sin inocular. En conclusión, las cepas A4 y K599 de *R. rhizogenes* en la transformación de raíz en planta de Chile originan una arquitectura de raíz diferente, y aunque la inducción del gen tipo receptor proteína cinasa permanece alto, la interacción amigable con agente avirulento se ve comprometida.

Palabras clave:

*Agrobacterium rhizogenes*, *Capsicum annuum*, raíces pilosas, planta compuesta.

**ABSTRACT** A strategy to search for a better performance in the radical system of chili pepper plants in relation to its behavior during the interaction with microorganisms and the absorption of water and nutrients, is the root transformation with *Rhizobium rhizogenes* to produce composite plants, that means, plant with normal foliage and transformed roots. *R. rhizogenes* strains differ in their virulence when inoculated in genetic backgrounds of cultivated or wild plants. A pending task is the optimization of the protocol of root transformation in pepper plants and also, the physiological analysis of the transformed root and the rhizosphere. The aim of this work was the analysis of the phenotypic differences of the roots of mirasol creole pepper plants transformed with *R. rhizogenes* A4 and K99 strains; the changes in the architecture of the radical system and the behavior of the root during the interaction with avirulent and virulent strains of binucleate *Rhizoctonia solani*. Furthermore, the study of expression of a receptor-like protein-kinase gene as a supposed defense gene. Results showed that root transformation in chili pepper with K599 and A4 strains of *R. rhizogenes* had 64% and 100% frequency of transformed plants, respectively. Also, the A4 strain promoted the formation of a high number of adventitious roots, meanwhile the K599 strain promoted larger adventitious roots. Nevertheless, in plants with transformed roots, the root-*R. solani* binucleated avirulent interaction was compromised, although the level of expression of the gene in study increased notably in comparison to plants with uninoculated and transformed roots, or uninoculated untransformed roots. In conclusion, root transformation of chili pepper plantlets with A4 and K599 *R. rhizogenes* strains originate differential architecture in roots, and even a high expression of the receptor-like protein kinase gene, the friendly interaction is compromised.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, *Capsicum annuum*, hairy roots, composite plant.

## I N T R O D U C C I Ó N

La función esencial de la raíz en la planta es darle anclaje además de absorber y conducir agua y minerales disueltos. La dimensión que alcanza la raíz en el suelo tanto en profundidad como en amplitud impacta notablemente en la cantidad de agua y nutrientes que esta aporta al resto de la planta. Las raíces modificadas por efecto de la transformación por bacterias nativas del suelo tales como *Rhizobium rhizogenes* (antes *Agrobacterium rhizogenes*) hace cambiar notablemente la arquitectura del sistema radical. La transformación en plantas completas de *Capsicum annuum*, en lugar de transformación en explante para originar raíces pilosas (cabeludas) *in vitro*, es una estrategia para analizar la fisiología de la rizósfera y la función de genes en plantas completas compuestas. La eficiencia de transformación en la raíz es afectada por el fondo genético de la planta y de la bacteria (Aarouf *et al.*, 2012), y el tipo de tejido (radícula, cotiledón o hipocotilo) utilizado para el explante

arroja resultados con diferencias significativas tanto en el tiempo de inducción como en la frecuencia de inducción de raíces cabelludas (Setamam *et al.*, 2014). Un sistema radical transformado con *R. rhizogenes* resulta en un fenotipo de raíz cabelluda debido a un cambio en el balance hormonal (auxinas y citocininas) del tejido por la expresión de los genes *rol* que son transferidos a la célula vegetal al momento de la transformación, a partir del segmento T-DNA del plásmido Ri en la bacteria *R. rhizogenes* (Hashem, 2009). Por otro lado, se ha reportado que células vegetales transformadas con plásmido pRiA4 presentan mayor tolerancia a estrés abiótico, y que la transformación con *R. rhizogenes* modifica substancialmente la inducción transcripcional de genes específicos de proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPKs) (Veremeichik *et al.*, 2014). En un trabajo previo en nuestro grupo de trabajo en sistema de chile-*Rhizoctonia* binucleada, aislamos un gen tipo receptor proteína cinasa que se induce en la raíz cuando es inoculada con una cepa avirulenta de *R. solani* binucleada. El objetivo del presente trabajo es buscar la optimización del protocolo para la transformación en raíces de *C. annuum* para generar rápidamente plantas completas compuestas, y analizar el impacto de la transformación de la raíz, cuando esta interactúa con microorganismos, ya sean agentes benéficos o patógenos, nativos de los suelos agrícolas.

## M A T E R I A L E S Y M É T O D O S

Cepas A4 y K599 de *R. rhizogenes* fueron utilizadas para transformar la raíz en plantas de chile. La cepa K599 fue transformada con pCAMBIA 1305.2, cepa A4 previamente transformada con pESC. Plantas de chile mirasol de 7 días de edad crecidas *in vitro* fueron inoculadas con aguja hipodérmica en raíz con suspensión de bacterias a una concentración de  $10^9$  células/ml. Alternativamente, en las plantas las raíces fueron podadas dejando solo el 10% por debajo del cuello de la raíz cortando con escalpelo y enseguida la planta por la porción de la raíz podada se sumergió en suspensión de bacterias por un min; se incluyó plantas control en medio de cultivo sin bacteria. Las plantas enseguida fueron colocadas en medio MS sólido y el co-cultivo permaneció 10 días a 27°C, humedad relativa de 70% y fotoperiodo de 12 h luz. Después las plantas se llevaron a medio MS con cefotaxima 0.5 mg/ml por 15 días. A los 30 días de la inoculación se cuantificaron las variables de la longitud de la raíz y el número de raíces laterales. En segmentos de raíz de cada tratamiento se procedió con prueba histoquímica para la b-glucuronidasa (tinción *GUS*).

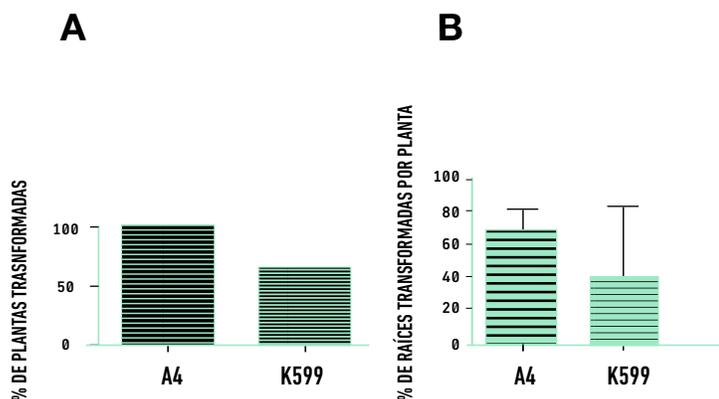
En las pruebas de confrontación de plantas con hongo agente avirulento y hongo patógeno, plantas con raíz transformada y plantas control (sin transformar) mantenidas *in vitro* en medio MS fueron inoculadas en la raíz con segmento (10x3 mm) de medio PDA con crecimiento fresco de *Rhizoctonia solani* binucleada (avirulenta) y multinucleada (virulenta) de manera independiente. Para cada tratamiento se destinaron doce plantas, las plantas control sin inocular. Para cuantificar el nivel de daño en la raíz y en la planta completa se aplicó una escala de 0 a 4 en donde 0= planta sana, 1 = de 1 a 25% de decoloración en la raíz, 2 = de 25 a 50% de decoloración de raíz, 3 = de 50 a 75%, y 4 = planta con decoloración o necrosis total. Se evaluó cada 24 h hasta los 10 días. Para el análisis de microscopía en contraste de fase, se tomaron muestras de tejido y se realizaron tinciones con azul de tripano. Para obtener el porcentaje de lesión en los tejidos de la raíz, en cada tratamiento se tomaron doce imágenes y se analizaron en Software Assess 2.0. Con los datos se realizó el análisis de varianza y la prueba de Tukey. Para los estudios de expresión del gen tipo receptor proteína cinasa, se analizó la expresión relativa mediante RT-PCR en tiempo real, en muestras de RNA total extraído de plantas de chile con raíz transformada y en interacción con *Rhizoctonia* binucleada avirulenta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las plantas con raíz podada la eficiencia de transformación fue mayor comparado con plantas sin podar. Los porcentajes se situaron en 64 y 100% de sistema radical transformado con cepas K599 y A4 respectivamente (Figura 1). Con la cepa K599 se produjeron raíces laterales con mayor longitud que alcanza los 8.1 cm contra 6.05 cm de la cepa A4. En la transformación con A4 la raíz presenta un fenotipo más ramificado y cabelludo (Figura 2). Estos porcentajes de transformación para generar plantas compuestas (solo raíz transformada) son mayores a los reportados por Jayahsankar (1997) en Chile en el que se obtuvo un 24%; mientras que con el mismo protocolo, en *Vigna unguiculata* el valor asciende a 80% (Mellor *et al.*, 2012) y en *Phaseolus vulgaris* entre un 50 y 75%, dependiendo del genotipo en planta (Colpaert *et al.*, 2008).

**FIG. 1.**

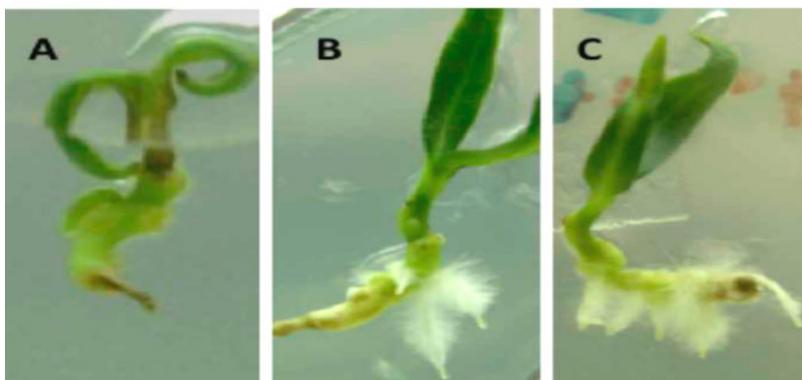
Eficiencia de transformación de plántulas de Chile con raíz normal y raíz podada. Datos tomados a los 30 días después de ser transformadas con cepas de *Rhizobium rhizogenes*. En A, porcentaje de plantas transformadas con cepa K599 y A4 en plantas con raíz podada. En B, porcentaje de raíces transformadas por planta por cada tratamiento.

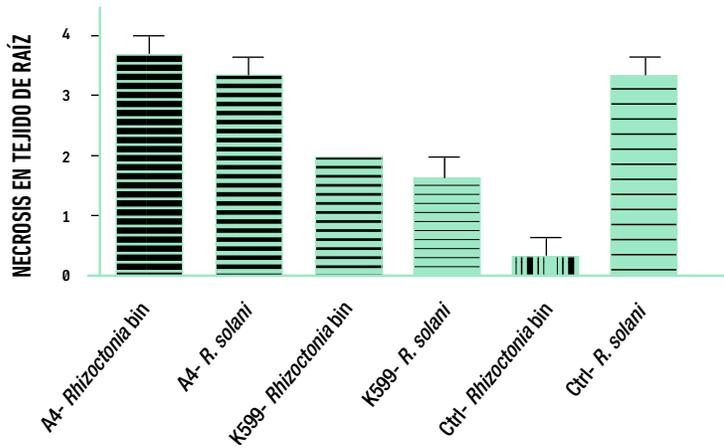


En las pruebas de interacción planta-agente avirulento (*R. solani* binucleada avirulenta), sorprendentemente, la interacción amigable resulta comprometida; el nivel de daño se incrementa con respecto a planta control con raíz normal sin transformar (Fig. 3). Por otro lado, aunque la interacción amigable en raíz inoculada con *R. solani* avirulenta se ve comprometida, los resultados de RT-PCR a tiempo real para analizar los niveles de inducción del gen tipo receptor proteína cinasa, tomando como base la expresión en planta de Chile sin transformar y sin inocular con el hongo, a las 8 h de iniciado el experimento, el valor se incrementa 3 veces tan solo en planta con raíz transformada con cepa A4 aún sin inocular con *R. solani* binucleada avirulenta, y el nivel de inducción se incrementó 6 veces cuando la planta con raíz transformada se inoculó con el hongo avirulento.

**FIG. 2.**

Plántulas de Chile con raíz podada a los 28 días después de ser transformada con cepas de *R. rhizogenes*. En A, planta control sin bacteria. En B, planta transformada con cepa K599. En C, Planta transformada con cepa A4.



**FIG. 3.**

Nivel de daño por necrosis en tejido de raíz de chile transformada con cepas A4 y K599 de *R. rhizogenes*.

**CUADRO 1.**

Valores  $\Delta\Delta CT$ , para el gen tipo *R* en planta transformada y sin transformar

TRATAMIENTOS	$\Delta CT$ ACTINA- GEN TIPO R	$\Delta\Delta CT$	(2- $\Delta\Delta CT$ ) EXPR. REL.
Control 8 h.	6.015 ± 0.09	0 ± 0.092	1
A4/Control 8 h	3.915 ± 0.19	-2.1 ± 0.14	4.305
A4/R.bin 8 hpi	3.2 ± 0.46	-2.815 ± 0.275	7.162
Control 16 h.	2.52 ± 0.08	0 ± 0.21	1
A4/Control 16 h	3.645 ± 0.56	1.125 ± 0.32	0.469
A4/R.bin 16 hpi	3.19 ± 0.04	0.67 ± 0.06	0.628

Posteriormente, a las 16 h post-inoculación, los valores de inducción de este gen en plantas con raíces transformadas e inoculadas con el hongo avirulento, regresan a sus valores basales equivalentes a los de planta control sin transformar y sin inocular. Con estos resultados, es evidente entonces que la raíz de chile simplemente transformada con *Rhizobium rhizogenes* presentó una reprogramación de genes que involucra incluso algunos genes de defensa, entre estos este gen tipo receptor proteína cinasa, gen que además responde con mayores niveles de inducción ante la presencia del agente avirulento *R. solani* binucleada avirulenta. La reprogramación de genes de defensa en planta en confrontación con *R. rhizogenes* o *Rhizobium radiobacter* (antes *A. tumefaciens*) es algo que ya ha sido reportado (Ditt *et al.*, 2006) igualmente, la

respuesta de defensa en raíces cabelludas transformadas con *R. rhizogenes* mantenidas en cultivo *in vitro*, continua normal cuando son estimuladas con inductores clásicos de respuesta de defensa como el metil jasmonato (Gharechahi *et al.*, 2013), o cuando son confrontadas con algún parásito (Mellor *et al.*, 2012), sin embargo, la reprogramación de genes en tejido transformado y ya libre de bacteria, con semanas después de la transformación con *R. rhizogenes*, es un tema en gran medida aún desconocido (Pitzschke *et al.*, 2010). Un fenotipo de hojas corrugadas y entrenudos cortos ha sido reportado en plantas de Chile que han sido transformadas en la raíz con *A. rhizogenes* (*R. rhizogenes*) (Jayashankar *et al.*, 1997) o un morfotipo con un mayor número de hojas y un sistema de raíz más ramificado (Rawat *et al.*, 2013), lo que indica que al menos, en plantas así transformadas para obtener plantas compuestas (solo la raíz transformada) se tiene un balance hormonal bastante diferente comparado con planta normal sin transformar, y este cambio hormonal, también impacta en el perfil de la expresión de algunos genes, relacionados particularmente con respuesta de defensa ante estrés biótico.

## C O N C L U S I O N E S

---

En Chile mirasol utilizando plántulas con raíz podada, la cepa A4 de *R. rhizogenes* produce mejores resultados de transformación de raíces comparado con la cepa K599, arrojando el 100% de plantas transformadas y un 64% de raíces transformadas por planta, dato que conduce a una optimización del protocolo, en donde en trabajos previos se ha reportado un 24% de transformación (Jayashankar *et al.*, 1997). La transformación de Chile con cepa A4 origina una raíz más ramificada, mientras que la cepa K599 produce raíces de mayor longitud; aunque en estas plantas, la interacción amigable con cepa avirulenta de *Rhizoctonia solani* binucleada se ve comprometida; sin embargo, estas mismas plantas muestran por sí mismas sin inductor alguno, altos niveles de inducción de un gen de defensa tipo receptor proteína cinasa; mismas raíces que en interacción con el agente avirulento de *R. solani* binucleada muestran un incremento aún mayor en la expresión del mismo gen. Con base a lo anterior, en Chile mirasol la transformación de la raíz conduce a cambios que impactan notablemente a nivel fisiológico y molecular en la interacción con cepas de *R. solani*.

**R E F E R E N C I A S**

- AARROUF J., Castro-Quesada P., Mallard S., Caromel B., Lizzi Y. and Lefebvre V. 2012. *Agrobacterium rhizogenes*-dependent production of transformed roots from foliar explants of pepper (*Capsicum annuum*): a new and efficient tool for functional analysis of genes. *Plant Cell Rep* 31:391-401.
- COLPAERT N., Tillerman S., Montagu M., Gheysen G., Terryn N. (2008) Composite *Phaseolus vulgaris* plants with transgenic roots as research tool. *African J Biotechnology* 7:404-408.
- DITT RF, Kerr KF, de Figueiredo P, Delrow J, Comai L, Nester EW (2006) The *Arabidopsis thaliana* transcriptome in response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 665-681
- GHARECHAH J., Khaili M., Hasanloo T, Salekdeh GH. (2013) An integrated proteomic approach to decipher the effect of methyl jasmonate elicitation on the proteome of *Silybum marianum* L. hairy roots. *Plant Physiol Biochem* 70:115-122.
- HASHEM EA. (2009) Estimation of the endogenous auxins and cytokinins in hairy roots incited on *Solanum dulcamara* plants by Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Aust J Basic Appl Sci.* 7(1):142-147.
- JAYASANKAR S., Bagga S., Philips G. (1997) Sweet pepper (*Capsicum annuum*) transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Hort Science* 32:454.
- MELLOR KE., Hoffmman AM., Timko MP. (2012) Use of ex vitro composite plants to study the interaction of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) with the root parasitic angiosperm *Strigales nerioides*. *Plant Methods* 8:22.
- PITZSCHKE A. and Hirt H. (2010) New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *EMBO Journal* 29:1021-1032.
- RAWAT JM., Rawat B., Mehrotra S. (2013) Plant regeneration, genetic fidelity, and active ingredient content of encapsulated hairy roots of *Picrorhiza kurrooa* Royle ex Benth. *BiotechnolLett.* 35:961-968.
- SETAMAM NM, JaafarSidik N, Abdul Rahman Z, Che MohdZain CR. (2014) Induction of hairy roots by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in different types of *Capsicum* species explants. *BMC Res Notes.* 7: 414.
- VEREMEICHLK G.N., Shkryl Y.N., Pinkus S.A., Bulgakov V.P. 2014. Expression profiles of calcium-dependent protein kinase genes (CDPK1-14) in *Agrobacterium rhizogenes* pRiA4-transformed calli of *Rubia cordifolia* under temperature- and salt-induced stress. *J Plant Physiol* 7:467-474.